



# Sélection d'échelle automatique précise et seuillage localement adapté pour la segmentation de vésicules en microscopie TIRF

Antoine Basset, Jérôme Boulanger, Patrick Bouthemy, Charles Kervrann,  
Jean Salamero

## ► To cite this version:

Antoine Basset, Jérôme Boulanger, Patrick Bouthemy, Charles Kervrann, Jean Salamero. Sélection d'échelle automatique précise et seuillage localement adapté pour la segmentation de vésicules en microscopie TIRF. *Reconnaissance de Formes et Intelligence Artificielle (RFIA)* 2014, Jun 2014, Rouen, France. hal-00988759

**HAL Id: hal-00988759**

**<https://hal.science/hal-00988759>**

Submitted on 12 May 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Sélection d'échelle automatique précise et seuillage localement adapté pour la segmentation de vésicules en microscopie TIRF

A. Basset<sup>1</sup>

J. Boulanger<sup>2</sup>

P. Bouthemy<sup>1</sup>

C. Kervrann<sup>1</sup>

J. Salamero<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inria, Centre Rennes Bretagne Atlantique, Campus Universitaire de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex

<sup>2</sup> CNRS, Institut Curie, UMR 144, 12 rue Lhomond, 75005 Paris

antoine.basset@inria.fr

## Résumé

*En imagerie cellulaire et microscopie de fluorescence, la première phase de l'analyse consiste généralement à détecter une grande quantité d'éléments (molécules, vésicules). De nombreuses méthodes de détection ont été développées dans ce contexte, mais elles réclament souvent un paramétrage assez fin et ne peuvent pas toujours s'adapter à l'échelle des éléments à détecter. Nous proposons une méthode incluant une sélection d'échelle automatique précise et un seuillage localement adapté. Des expérimentations quantitatives sur images simulées montrent les avantages et les meilleures performances de notre méthode. Des résultats sur séquences réelles confirment son intérêt.*

## Mots Clef

Microscopie TIRF, segmentation, sélection d'échelle.

## Abstract

*In live cell and fluorescence microscopy, the first step of the analysis often consists in detecting a large amount of elements (molecules, vesicles). Many detection methods have been developed to this purpose, but they often need a fine tuning stage and cannot automatically fit the object scale. We propose a segmentation method with an automatic accurate scale selection and a locally adapted thresholding. Quantitative experiments on synthetic sequences demonstrate the advantages and better performance of our method. Its interest is confirmed by results on real sequences.*

## Keywords

TIRF microscopy, segmentation, scale selection.

## 1 Introduction

Dans le cadre de l'analyse d'images de microscopie optique, la détection automatisée des éléments d'intérêt constitue la plupart du temps une étape préliminaire essentielle qui conditionne l'ensemble de l'étude, que ce soit le suivi de vésicules [7], la caractérisation de dynamiques membranaires [2], ou la classification de mouvements [10]. Intéressés par les dynamiques de trafic membranaire, nous cherchons à segmenter des vésicules (des intermédiaires de transport de molécules) imagées en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Ces vésicules

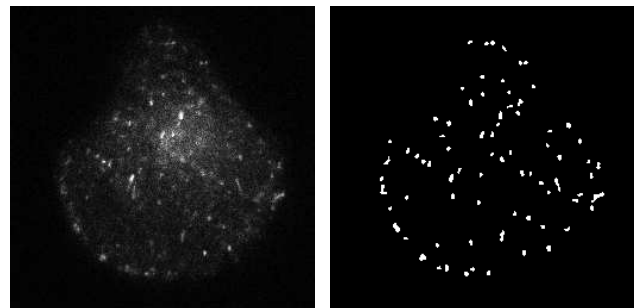


FIGURE 1 – Segmentation de vésicules par notre méthode dans une image extraite d'une séquence de microscopie TIRF : protéine Rab11-mCherry dans une cellule M10.

sont généralement de taille semblable, et il convient donc de détecter cette échelle caractéristique. Un exemple de segmentation est donné à la figure 1.

Des études comparatives [9, 12] ont permis d'évaluer les performances de nombreuses méthodes de détection non supervisées : produit multi-échelle d'ondelettes (*wavelet multiscale product* [8]), détection multi-échelle après stabilisation de variance (*multiscale variance-stabilizing transform detector* [17]), filtrage par chapeau haut-de-forme (*top-hat filter* [4], et *grayscale opening top-hat filter* [13]), détection de dômes (*h-dome* [15], et *maximum possible height-dome* [9]), détection après accentuation des spots (*spot-enhancing filter* [10]), et extraction de points caractéristiques (*image feature-based detector* [14]). La plupart de ces méthodes comprennent plusieurs paramètres devant être finement réglés pour obtenir de bons résultats [9, 12].

Afin de réduire le nombre et la sensibilité des paramètres, nous avons développé une méthode de segmentation de vésicules avec sélection d'échelle automatique dénommée SLT-LoG et décrite dans [1]. Elle s'appuie sur un filtre laplacien de gaussienne, dont la variance est automatiquement sélectionnée dans un ensemble fini de valeurs prédéfinies. Un seuil local permet de décider en chaque pixel si celui-ci appartient ou non à une vésicule. Sous l'hypothèse d'une distribution localement gaussienne des intensités de l'image, le seuil est déduit d'une probabilité de fausse alarme (PFA), choisie par l'utilisateur.

Dans [1], la sélection d'échelle repose sur un filtre gaussien échantillonné. Lindeberg [6] a démontré que, dans le cadre

des espaces multi-échelles, le rapport entre deux échelles successives de ce filtre doit être un entier impair. Un rapport de 3 avait ainsi été choisi dans [1]. Ceci se traduit par une estimation grossière de l'échelle, provoquant des erreurs de segmentation, lorsque de petits éléments sont très proches les uns des autres dans l'image. Pour dépasser cette limitation, nous avons recours à un autre filtre pour construire l'espace multi-échelle, mieux adapté aux petits objets : le filtre discret analogue au filtre gaussien [6]. Il permet de choisir arbitrairement le rapport entre deux échelles successives testées, les propriétés d'espace multi-échelle étant conservées. À échelle petite cependant, son comportement, différent de celui du filtre échantillonné, impose une nouvelle stratégie de sélection d'échelle. De plus, pour améliorer la segmentation des images les plus complexes, au fond très hétérogène, nous proposons une nouvelle façon d'estimer le seuil local de détection. L'article est structuré comme suit. La section 2 décrit la construction de l'espace multi-échelle. Nous proposons deux nouveaux critères de sélection d'échelle dans la section 3 avec une évaluation comparative. La section 4 introduit un nouveau seuillage local adapté pour la segmentation de vésicules, dont les résultats sont décrits en section 5. Enfin, nous concluons en section 6.

## 2 Détection de « blobs »

Nous considérons une famille multi-échelle  $L(I)$  d'une image  $I$  de domaine  $\Omega$  :

$$L(I) : \Omega \times \mathbb{R}_+ \rightarrow \mathbb{R} \\ (x, y, t) \mapsto (K_t * K_t^T * I)(x, y), \quad (1)$$

où  $*$  est l'opérateur de convolution,  $T$  l'opérateur de transposition et  $K_t$  un noyau de convolution 1D d'échelle  $t$  ( $K_t * K_t^T$  est un noyau de convolution 2D séparable).

Dans [1], nous avons utilisé le filtre gaussien échantillonné de variance  $t$ , simple à construire, mais qui ne peut être utilisé comme noyau multi-échelle que si les rapports d'échelles testées sont des entiers impairs [6]. En pratique, nous avons choisi  $t \in \{1; 3; 9; 27; 81\}$ .

Dans le but d'analyser le comportement de vésicules au sein de cellules dans des images acquises en microscopie TIRF, nous nous intéressons aux petites échelles. En effet, les vésicules ont généralement un diamètre de quelques pixels, et peuvent également être distantes les unes des autres de quelques pixels. Afin de diminuer les erreurs de segmentation d'objets si rapprochés, il faut choisir très précisément l'échelle de  $T_t$ . Pour obtenir un échantillonnage arbitrairement précis de l'échelle, le noyau de convolution doit être tel que la famille multi-échelle  $L(I)$  respecte l'équation de la chaleur [6] :

$$\frac{\partial L(I)}{\partial t} = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) L(I). \quad (2)$$

Dans un espace continu, le filtre gaussien est solution. Dans un espace discret, comme une image numérique, il faut utiliser le filtre discret analogue au filtre gaussien (dénommé,

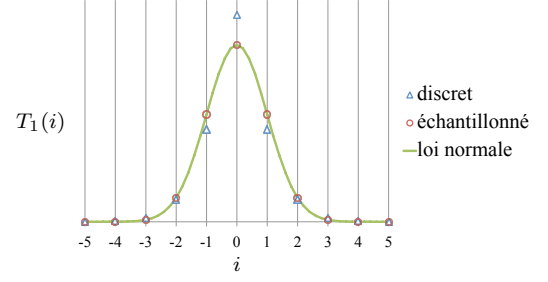


FIGURE 2 – Comparaison entre les noyaux gaussiens discret et échantillonné, à l'échelle  $t = 1$ .

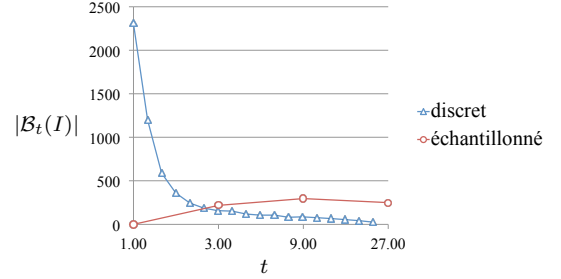


FIGURE 3 – Nombre de blobs détectés  $|B_t(I)|$  en fonction de l'échelle  $t$  dans une image synthétique, qui contient des spots gaussiens de variance 16 et est entachée d'un bruit de Poisson.

pour simplifier, *gaussien discret*). À grande échelle, le filtre gaussien échantillonné en est une bonne approximation. Cependant, seul le noyau gaussien discret permet d'accéder à des échelles réelles  $t \in \mathbb{R}_+$  arbitraires [6]. Il est défini ainsi :

$$\forall i \in \mathbb{Z}, K_t(i) = e^{-t} \mathcal{I}_i(t), \quad (3)$$

où  $\mathcal{I}_i$  est la fonction de Bessel modifiée d'ordre entier  $i \in \mathbb{Z}$ . La figure 2 illustre la différence entre les noyaux gaussiens échantillonné et discret à petite échelle.

On définit  $H(I)$  le laplacien de gaussienne multi-échelle normalisé de  $I$ , de la façon suivante :

$$\forall t \in \mathbb{R}_+, H_t(I) = t \nabla^2 * L_t(I), \quad (4)$$

où  $\nabla^2$  est le noyau laplacien discret isotrope [6] :

$$\nabla^2 = \begin{pmatrix} 1/6 & 2/3 & 1/6 \\ 2/3 & -10/3 & 2/3 \\ 1/6 & 2/3 & 1/6 \end{pmatrix}. \quad (5)$$

Lindeberg [6] définit un blob  $b = (x_b, y_b, t_b)$  de  $I$  comme un minimum local de  $H(I)$  :

$$\forall (x, y, t) \in V(b), H_{t_b}(I)(x_b, y_b) \leq H_t(I)(x, y), \quad (6)$$

avec  $V(b)$  un voisinage  $3 \times 3 \times 3$  de  $b$ . On obtient un ensemble  $\mathcal{B}(I) \in \Omega \times \mathbb{R}_+^*$  de blobs. Notons  $\mathcal{B}_t(I) = \{(x_b, y_b, t_b) \in \mathcal{B}(I) \mid t_b = t\}$  l'ensemble des blobs détectés à l'échelle  $t$ , et  $|B_t(I)|$  leur nombre.

## 3 Sélection de l'échelle

La figure 3 illustre le nombre de blobs détectés aux échelles testées, selon le noyau utilisé. Dans [1], nous sélectionnons l'échelle, parmi celles testées, comprenant le plus

grand nombre de blobs. Avec ce même critère, nous obtiendrions presque systématiquement la plus petite échelle testée avec le filtre gaussien discret. Nous proposons donc une nouvelle stratégie de sélection d'échelle.

### 3.1 Nouveaux critères de sélection

Un point de  $I$  peut être un blob avec une probabilité  $p(b_t | I)$ , ou non avec une probabilité  $1 - p(b_t | I)$ . Supposons que l'image  $I$  est corrompue par un bruit additif gaussien  $\varepsilon$ , tel que  $I = I_0 + \varepsilon$ . Certains blobs ne correspondent pas à des vésicules imagées, mais proviennent du bruit  $\varepsilon$ . S'ils sont extraits par la méthode de segmentation, ce sont de fausses détections, ou « faux blobs ». Notons  $p(b_t^\varepsilon | I)$  la probabilité qu'un point soit un faux blob. Inversement, dénommons « vrais blobs » ceux provenant de  $I_0$ , et notons  $p(b_t^0 | I)$  la probabilité qu'un point soit un vrai blob. Nous proposons deux critères de sélection d'échelle :

$$C_1 : t^* = \arg \max_t p(b_t^0 | I) ; \quad (7)$$

$$C_2 : t^* = \arg \min_t \frac{p(b_t^\varepsilon | I)}{p(b_t^0 | I)} . \quad (8)$$

$C_1$  maximise la probabilité de vraies détections, et  $C_2$  minimise la proportion de fausses détections.

Par construction,  $p(b_t^0 | I) = p(b_t | I) - p(b_t^\varepsilon | I)$ . De plus, on peut approcher  $p(b_t | I)$  empiriquement par  $|\mathcal{B}_t(I)|/|I|$ , où  $|I|$  est le nombre de pixels de  $I$  ; il reste à estimer  $p(b_t^\varepsilon | I) \approx p(b_t^\varepsilon | \varepsilon)$ . Nous pourrions estimer  $\varepsilon$  en débruitant  $I$ , mais afin de garder une méthode simple et efficace, nous préférons simuler  $\varepsilon$ . Remarquons que l'ensemble des blobs est invariant par changement linéaire de contraste, et que nous pouvons donc nous ramener à un bruit gaussien centré réduit<sup>1</sup>. Nous modélisons alors la probabilité de détecter un faux blob dans  $I$  par :  $\forall t \in \mathbb{R}_+^*$ ,  $p(b_t^\varepsilon | I) \approx |\mathcal{B}_t(\tilde{\varepsilon})|/|\tilde{\varepsilon}|$ , où  $\tilde{\varepsilon}$  est une image aléatoire gaussienne centrée réduite. Pour limiter l'effet du bruit de quantification (le comptage du nombre fini de blobs),  $|\tilde{\varepsilon}|$  doit être grand : nous utilisons une image  $\tilde{\varepsilon}$  de taille  $4096 \times 4096$  pixels (sur nos images, les résultats de segmentation ne varient pas en augmentant la taille de  $\tilde{\varepsilon}$ ).

Nous déduisons de (7), (8) et de l'expression des probabilités impliquées, les valeurs de  $t^*$  pour les deux critères :

$$\text{pour } C_1, t^* = \arg \max_t \frac{|\mathcal{B}_t(I)|}{|I|} - \frac{|\mathcal{B}_t(\tilde{\varepsilon})|}{|\tilde{\varepsilon}|} ; \quad (9)$$

$$\text{pour } C_2, t^* = \arg \max_t \frac{|\mathcal{B}_t(I)|}{|\mathcal{B}_t(\tilde{\varepsilon})|} . \quad (10)$$

Les images que nous traitons sont acquises en microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Avec ce type d'acquisition, nous pouvons postuler que le bruit est composé d'un bruit de grenaille, poissonnien, et d'un

1. Notons  $m$  la moyenne et  $s$  l'écart-type de  $\varepsilon$ . Soit  $b = (x_b, y_b, t_b)$  un blob de  $\varepsilon$ , et prenons  $(x, y, t) \in V(b)$ . D'après (6),  $H_t(\varepsilon)(x, y) > H_{t_b}(\varepsilon)(x_b, y_b)$ . Puisque  $s > 0$ ,  $[H_t(\varepsilon)(x, y) - H_t(m)(x, y)]/s > [H_{t_b}(\varepsilon)(x_b, y_b) - H_{t_b}(m)(x_b, y_b)]/s$ . Enfin, par linéarité de  $t\nabla^2$  et  $T_t$ ,  $H_t((\varepsilon - m)/s)(x, y) > H_{t_b}((\varepsilon - m)/s)(x_b, y_b)$ . Ainsi,  $b \in \mathcal{B}((\varepsilon - m)/s)$ , et  $\mathcal{B}(\varepsilon) \subset \mathcal{B}((\varepsilon - m)/s)$ . Par un raisonnement analogue, on obtient  $\mathcal{B}((\varepsilon - m)/s) \subset \mathcal{B}(\varepsilon)$ , donc  $\mathcal{B}(\varepsilon) = \mathcal{B}((\varepsilon - m)/s)$ .

TABLEAU 1 – Sensibilité au rapport d'échelles

$\sigma^2$	Rapport entre échelles successives					
	1,1	1,2	1,5	2	3	3
Échelle sélectionnée par $C_2$						
1	1,33	1,44	1,5	2	1	3
2,25	2,59	2,99	2,25	2	3	3
4	4,18	4,30	5,06	4	3	3
9	8,95	8,92	7,59	8	9	9
16	15,86	15,41	17,09	16	27	9
25	23,23	22,19	25,63	32	27	27

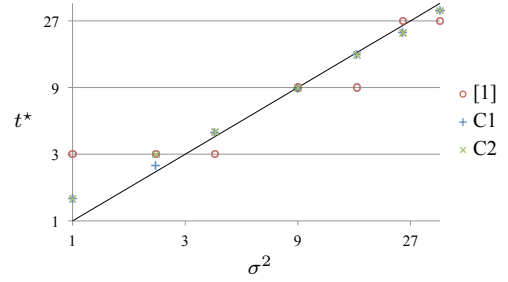


FIGURE 4 – Précision des critères de sélection d'échelle. Différentes images contenant des spots gaussiens de différentes échelles  $\sigma^2$  ont été générées [12]. Un bruit de Poisson a été ajouté, pour obtenir un SNR égal à 5.

bruit électronique, gaussien. Or les critères de sélection d'échelle que nous avons définis supposent un bruit gaussien. En appliquant une transformée d'Anscombe généralisée, nous pouvons revenir à un bruit gaussien [3]. Par ailleurs, si le flux de photons est suffisant, le bruit de Poisson peut être approché par un bruit gaussien et la transformation d'Anscombe évitée, car les critères proposés fonctionnent pour une variance quelconque du bruit gaussien.

### 3.2 Évaluation des critères

Pour valider la méthode de sélection d'échelle proposée, nous avons effectué des tests sur de nombreuses images synthétiques. Différentes séquences définies dans [12] ont été générées, contenant des spots gaussiens de différentes variances  $\sigma^2$  (ou échelles au sens de [6]), et différents rapports signal-sur-bruit (SNR).

Tout d'abord, plusieurs rapports d'échelle ont été testés. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Comme on peut s'y attendre, diminuer le rapport permet d'améliorer la précision de la sélection d'échelle, qui est bien retrouvée par le critère  $C_2$ . Par ailleurs, soulignons que l'échelle des plus petits spots ( $\sigma^2 = 1$ ) est retrouvée avec  $C_2$ , alors qu'elle ne l'était pas dans [1], où le noyau gaussien échantillonné pénalisait les petites échelles (cf. figure 2). Par la suite, nous utiliserons un rapport égal à 1,2, qui est un bon compromis entre temps de calcul et précision pour les images et résolutions (de l'ordre de  $512 \times 512$ ) que nous traitons. En effet, en diminuant davantage ce rapport, nous n'obtenons pas de meilleurs résultats de détection que ceux présentés dans la section 5.

Nous avons également comparé les deux critères de sélection d'échelle proposés (associés au filtre gaussien dis-

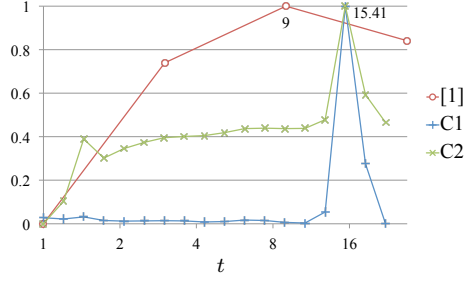


FIGURE 5 – Comportement des trois critères de sélection d'échelle (normalisés entre 0 et 1) pour la même image qu'à la figure 3, contenant des spots d'échelle 16.

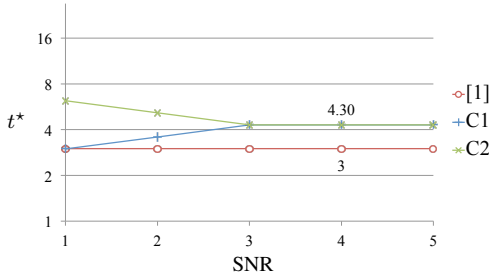


FIGURE 6 – Impact du bruit sur la sélection d'échelle. Les images générées présentent de petits spots gaussiens d'échelle 4.

cret) avec celui que nous avons exploité dans [1] (associé au filtre gaussien échantillonné). Les résultats sont rassemblés dans les figures 4 et 5. Les échelles sélectionnées par  $C_1$  et  $C_2$  sont précises et presque toujours identiques. En moyenne, la sélection est ainsi beaucoup plus précise avec le noyau gaussien discret.

Enfin, nous avons étudié l'impact du bruit sur la méthode. Comme on le voit sur la figure 6, pour des spots de petite taille, le critère  $C_1$  sous-estime l'échelle à SNR faible, tandis que le critère  $C_2$  la surestime, ce qui conduit à de meilleurs résultats de segmentation.  $C_2$  est un bon compromis entre vrais et faux positifs ;  $C_1$  permet de détecter plus de vrais positifs, au prix de quelques faux positifs supplémentaires. A partir d'un certain SNR, les critères sont équivalents, et nous retrouvons une échelle proche de celle des spots : 4,30 est bien la valeur testée la plus proche de 4. Pour augmenter la précision, il faudrait diminuer le rapport entre deux échelles consécutives, et donc augmenter le temps de calcul.

## 4 Segmentation de vésicules

Nous avons développé ces nouveaux critères de sélection d'échelle dans l'optique d'améliorer la méthode de segmentation SLT-LoG [1], dont le principal défaut était l'imprécision relative du choix de l'échelle, et en particulier une prédisposition à surestimer la taille de petits éléments. Pour valider l'approche proposée, nous avons remplacé la phase de sélection d'échelle de SLT-LoG par celle décrite en section 3. Par ailleurs, nous proposons une nouvelle technique d'estimation locale des paramètres de  $H_{t^*}(I)$  et d'adapta-

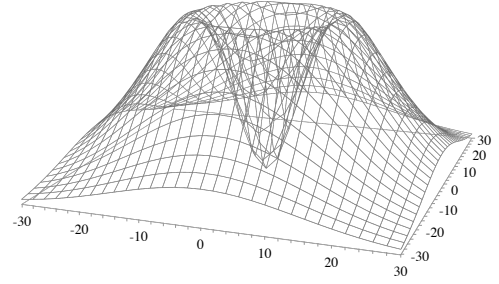


FIGURE 7 – Allure de la fenêtre creuse d'estimation du seuil local (avec  $\sqrt{t^*} = 6$  et  $s = 15$ ).

tion du seuil de détection.

### 4.1 Seuillage local de $H_{t^*}$

Une fois l'échelle  $t^*$  sélectionnée, nous nous intéressons à  $H_{t^*}$ . La représentation d'un élément fluorescent de  $I$  (tel qu'une vésicule) d'échelle  $t^*$  dans  $H_{t^*}(I)$  est négative de valeur absolue élevée. Ainsi, nous cherchons simplement un seuil  $\tau$  sous lequel un point de  $H_{t^*}(I)$  est considéré comme appartenant à une vésicule.

Pour des images au contenu complexe, un seuil global ne donne pas de résultats satisfaisants [1]. Il faut adapter le seuil à chaque pixel  $p$  de  $\Omega$ . Nous pouvons supposer que la transformée d'Anscombe de  $I$  suit localement une distribution gaussienne. Les opérations (1) et (4) étant des convolutions finies, la distribution de  $H_{t^*}(I)$  est également localement gaussienne. Ainsi,  $\tau(p)$  se déduit d'une valeur de probabilité de fausse alarme  $P_{fa}$ , choisie par l'utilisateur :

$$\tau : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$$

$$p \mapsto \Phi^{-1}(P_{fa}) \times \sigma(p) + \mu(p), \quad (11)$$

où  $\Phi$  est la fonction de répartition de la loi normale centrée réduite,  $\mu(p)$  la moyenne locale et  $\sigma(p)$  l'écart-type local de  $H_{t^*}(I)$ , que nous devons donc estimer.

Dans [1], nous avons proposé deux façons d'estimer ces grandeurs : dans une simple fenêtre carrée centrée en  $p$ , ou avec une pondération gaussienne des valeurs de  $H_{t^*}(I)$  autour de  $p$ . La fenêtre gaussienne s'avérait plus adaptée et de plus le choix de sa taille n'était alors plus critique.

Nous proposons ici un autre type de fenêtre, « creuse », permettant d'améliorer encore les performances, et dont les poids sont définis par une différence de gaussiennes :

$$w(i, j) = A \left( \exp - \frac{i^2 + j^2}{2s^2} - \exp - \frac{i^2 + j^2}{2t^*} \right), \quad (12)$$

où  $s \in \mathbb{R}_+^*$  et  $A$  est une constante de normalisation. L'allure de cette fenêtre pondérée est présentée à la figure 7. La pondération gaussienne « positive » s'effectue sur une zone de taille  $s^2$ , et le « creux » est adapté à l'échelle optimale  $t^*$ , qui est celle des éléments recherchés. Comme pour les méthodes de détection à taux de fausse alarme constant (CFAR) [11], cette fenêtre creuse permet d'atténuer l'impact de l'élément, lui-même présent dans la fenêtre, sur l'estimation du seuil, et d'estimer ainsi la distribution du



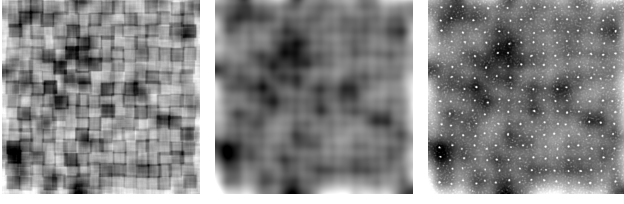


FIGURE 8 – Comparaison des cartes de seuil  $\tau(p)$  obtenues pour différents types de fenêtres d’estimation locale de la distribution de  $H_{t^*}(I)$  (calculées sur une image synthétique de type C présentée à la figure 9).

fond seul. La moyenne locale  $\mu(p)$  en un point  $p = (x, y)$  est ainsi estimée selon :

$$\mu(p) = \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^h w(x-i, y-j) H_{t^*}(I)(i, j), \quad (13)$$

où  $l$  et  $h$  sont respectivement la largeur et la hauteur de l’image  $I$ . De même, pour la variance  $\sigma^2(p)$  :

$$\sigma^2(p) = \left( \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^h w(x-i, y-j) H_{t^*}^2(I)(i, j) \right) - \mu^2(p). \quad (14)$$

Pour limiter le temps de calcul, nous utilisons plutôt une approximation récursive du filtre gaussien telle que définie dans [5] ou [16]. Les résultats donnés par le filtre de van Vliet et Young [16], plus isotrope que celui de Deriche [5], sont moins robustes dans les zones où le signal est faible ; nous utiliserons plutôt ce dernier. Des exemples de cartes de seuil  $\tau(p)$  sont donnés à la figure 8. Si les artefacts très prononcés liés à la fenêtre carrée disparaissent avec la pondération gaussienne, le seuil n’est pas assez discriminant aux endroits où se situent les spots. Il faut donc utiliser une valeur élevée de  $P_{fa}$  pour les détecter, ce qui ouvre la porte à la détection de faux positifs. La fenêtre creuse permet de remédier à ce problème.

## 4.2 Débruitage de la segmentation

Une fois le seuillage localement adaptatif appliqué, nous obtenons généralement une carte binaire de segmentation encore bruitée, dans laquelle les plus petits éléments (parfois réduits à des points) sont souvent de fausses détections dues au bruit. En effet, si un pixel de l’image brute a une valeur très élevée en raison du bruit, l’image filtrée par le LoG (qui est linéaire) a également une valeur très élevée en ce point – surtout si les objets, et donc l’échelle sélectionnée, sont très petits. Pour améliorer les performances de la détection, nous rejetons les plus petites composantes connexes.

Notons  $V_0$  l’ensemble des composantes connexes de la carte de segmentation, et  $|v|$  l’aire d’une composante connexe  $v$ . Comme dans [1], nous supprimons les composantes connexes dont l’aire est inférieure à  $\max(2, \pi t^*)$ . Ainsi, l’ensemble final des objets segmentés est :

$$V = \{v \in V_0 \mid |v| > \max(2, \pi t^*)\}. \quad (15)$$

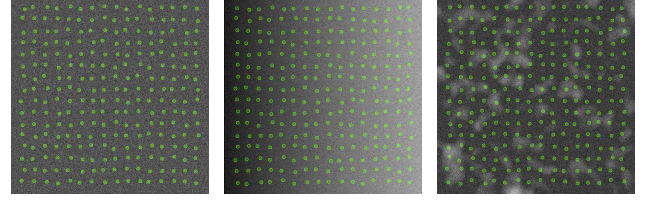


FIGURE 9 – Images du banc d’essai introduit dans [12]. Les spots sont repérés en vert pour plus de lisibilité.

## 5 Résultats expérimentaux

### 5.1 Résultats sur séquences synthétiques

Afin de comparer les performances de notre méthode de segmentation pour les différents critères de sélection d’échelle, nous l’avons appliquée aux images synthétiques introduites dans [12]. Il s’agit de séquences de 16 images de taille  $512 \times 512$  pixels, contenant une grille de 4096 spots gaussiens isotropes ou anisotropes. Trois types de fonds sont ajoutés : (A) valeur constante, (B) dégradé horizontal, (C) incluant de larges structures. Un bruit de Poisson est ensuite ajouté. Afin de comparer les résultats de notre méthode à ceux des méthodes fournis dans [1, 9, 12], nous prenons la même valeur de SNR, soit 2. Des exemples de telles images sont montrés à la figure 9.

Nous reprenons les notations de [12] : TP représente le nombre de vraies détections, FN le nombre de spots non détectés et FP le nombre de fausses détections. Les différentes méthodes sont évaluées selon le taux de vrais positifs  $\text{TPR} = \text{TP}/(\text{TP}+\text{FN})$ , et le taux de faux positifs modifié  $\text{FPR}^* = \text{FP}/(\text{TP}+\text{FN})$ .

Pour la méthode décrite dans cet article, des options identiques ont été retenues pour analyser toutes les séquences, synthétiques comme réelles, à savoir :  $t \in \{1; 1, 2; 1, 44; \dots; 38, 33\}$  et  $s = 15$  px. Le seul paramètre qui varie est donc  $P_{fa}$ , ce qui nous permet d’atteindre, comme dans [1, 9, 12], un  $\text{FPR}^*$  de 0,010 pour les séquences synthétiques (ici,  $0,005 < P_{fa} < 0,03$ ). En utilisant le rapport d’échelle 1,2, nous pouvons nous contenter, pour économiser le temps de calcul, de sélectionner l’échelle optimale sur une seule image  $512 \times 512$  par séquence. En pratique, l’échelle sélectionnée est la même que si nous utilisions les 16 images.

Nous avons évalué le temps d’exécution sur un ordinateur portable équipé de quatre cœurs cadencés à 2,3GHz avec 8Go de mémoire vive DDR3 à 1,6GHz. Pour la première image, le temps de calcul de la phase de sélection d’échelle est de l’ordre de 2 s. Une fois l’échelle sélectionnée, la segmentation prend environ 0,15 s par image. Ces durées sont proportionnelles à la taille des images.

Dans ce cas d’étude, le critère  $C_1$  est moins efficace que  $C_2$ . Nous présentons donc les résultats de la sélection d’échelle avec  $C_2$  pour la fenêtre d’estimation locale définie par (12). Pour certaines études cependant, on peut éliminer ces faux positifs (en exploitant des propriétés temporelles), et préférer  $C_1$  qui donnera alors de meilleurs ré-

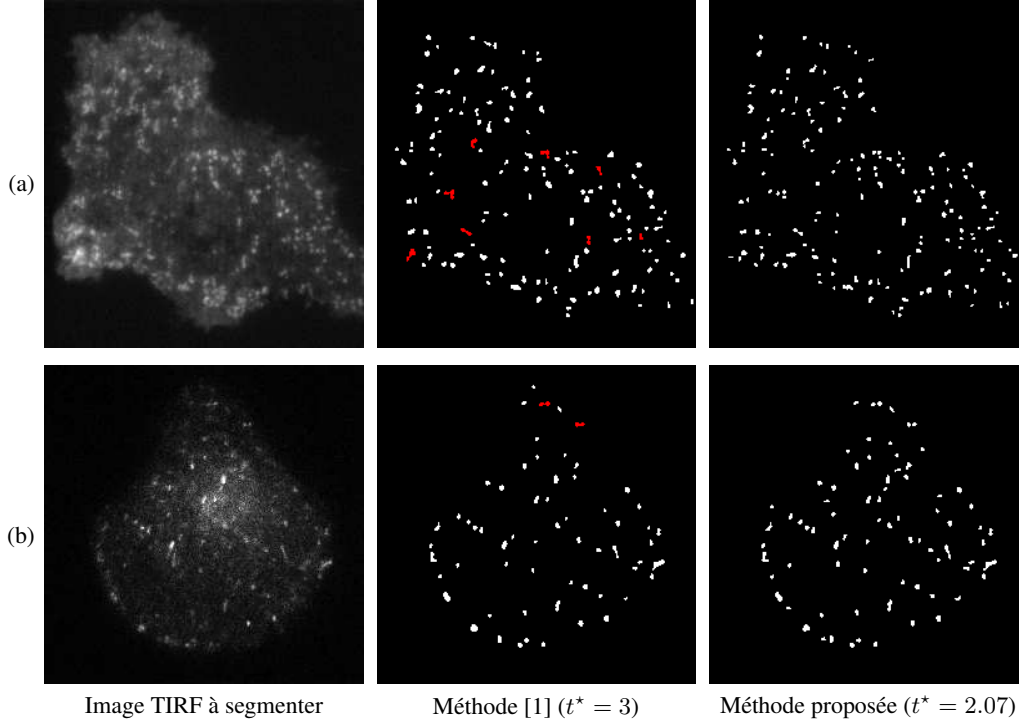


FIGURE 10 – Comparaison avec la sélection d’échelle de [1] sur des images réelles. Au centre, en rouge, des vésicules sont improprement fusionnées en raison d’une échelle sélectionnée trop grande.

TABEAU 2 – Comparaison avec les méthodes évaluées dans [1, 9, 12] à SNR = 2.

Type d’objets	Type de fond	TPR de SLT-LoG dans [1]	avec $C_2$	Meilleur TPR parmi 8 méthodes
Ronds	A	0,996	<b>0,999</b>	0,99
	B	0,987	<b>0,999</b>	0,99
	C	0,982	<b>0,990</b>	0,95
Allongés	A	<b>1<sup>+</sup></b>	<b>1<sup>+</sup></b>	0,99
	B	<b>1<sup>+</sup></b>	<b>1<sup>+</sup></b>	0,99
	C	<b>0,999</b>	0,996	0,97

FPR\* = 0,010 sauf pour 1<sup>+</sup> où FPR\* = 0.

sultats. Le tableau 2 montre que les performances de notre nouvelle approche surpassent à la fois la précédente méthode [1], et les huit autres méthodes de détection citées dans l’introduction et évaluées dans [9, 12]. Soulignons que les TPR de la dernière colonne sont obtenus par des méthodes différentes parmi les 8 testées.

## 5.2 Résultats sur séquences réelles

La figure 10 met en évidence les gains engendrés par la méthode de sélection d’échelle proposée. Nous avons réglé  $P_{fa}$  de façon à obtenir le plus grand nombre possible de vrais positifs, sans fausse détection.

Dans ces exemples de cellules M10 imagées en microscopie TIRF, les vésicules marquées (protéines Rab11-mCherry) sont parfois distantes de quelques pixels. Dans ces endroits, la surestimation de leur échelle par la méthode [1] ( $t^* = 3$ ) entraîne des erreurs de segmentation pouvant être évitées grâce à la nouvelle approche (qui sélectionne  $t^* = 2.07$ ). Le nombre d’erreurs de ce type représente 3%

à 6% du nombre de détections, sur les séquences réelles que nous avons segmentées (par manque de place, nous ne présentons que la figure 10).

De plus, l’échelle sélectionnée étant plus précise avec la nouvelle méthode, nous pouvons détecter plus de vésicules sans augmenter le nombre de fausses détections. Ainsi, à la figure 10a, 160 vésicules sont détectées par la nouvelle méthode, contre 138 par la précédente. De même, 76 vésicules sont détectées à la figure 10b par la nouvelle méthode, contre 61 par [1]. Enfin, notre méthode permet aussi de segmenter des vésicules allongées de forme quelconque.

## 6 Conclusion

Nous avons proposé une nouvelle méthode de segmentation de vésicules dans des séquences de microscopie TIRF. Le recours au filtre gaussien discret, deux nouveaux critères de sélection d’échelle de précision arbitraire et une fenêtre creuse pour l’estimation locale du seuil de détection permettent d’améliorer grandement les performances de segmentation par rapport à [1]. Nos résultats surpassent également ceux des méthodes existantes sur toutes les séquences présentées dans [12]. Sur les séquences réelles traitées, la segmentation des vésicules est d’une meilleure précision et fiabilité.

Enfin, cette nouvelle méthode ne demande quasiment pas de paramétrage, de sorte que nous avons utilisé les mêmes réglages pour toutes les séquences synthétiques et réelles que nous avons traitées. Elle est donc facilement utilisable par un biologiste, qui n’aura à fixer que la probabilité de fausse alarme.

## Références

- [1] A. Basset, J. Boulanger, P. Bouthemy, C. Kervrann, and J. Salamero. SLT-LoG: A vesicle segmentation method with automatic scale selection and local thresholding applied to TIRF microscopy. ISBI'14, Pékin, avril 2014.
- [2] A. Basset, P. Bouthemy, J. Boulanger, J. Salamero, and C. Kervrann. Detection and classification of dynamic sub-cellular events in TIRF microscopy sequences. ISBI'14, Pékin, avril 2014.
- [3] J. Boulanger, C. Kervrann, P. Bouthemy, P. Elbau, J.-B. Sibarita, and J. Salamero. Patch-based non-local functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans. Medical Imaging*, 29(2):442–453, fév. 2010.
- [4] D. Bright and E. Steel. Two-dimensional top hat filter for extracting spots and spheres from digital images. *J. Microscopy*, 146(2):191–200, mai 1987.
- [5] R. Deriche. Fast algorithms for low-level vision. *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 12(1):78–87, jan. 1990.
- [6] T. Lindeberg. *Scale-space theory in computer vision*. Engineering and computer science, Robotics: Vision, manipulation and sensors. Springer, 1993.
- [7] E. Meijering, O. Dzyubachyk, and I. Smal. *Methods for cell and particle tracking*. Elsevier, 2012.
- [8] J.-C. Olivo-Marin. Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognition*, 35(9):1989–1996, sept. 2002.
- [9] S. Rezatofghi, R. Hartley, and W. Hughes. A new approach for spot detection in total internal reflection fluorescence microscopy. In *IEEE Int. Symp. Biomedical Imaging*, ISBI'12, Barcelone, mai 2012.
- [10] D. Sage, F. Neumann, F. Hediger, S. Gasser, and M. Unser. Automatic tracking of individual fluorescence particles: Application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Trans. Image Processing*, 14(9):1372–1383, sep. 2005.
- [11] L. Scharf. *Statistical Signal Processing: Detection, Estimation, and Time Series Analysis*. Addison Wesley, 1990.
- [12] I. Smal, M. Loog, W. Niessen, and E. Meijering. Quantitative comparison of spot detection methods in fluorescence microscopy. *IEEE Trans. Medical Imaging*, 29(2):282–301, fév. 2010.
- [13] P. Soille. *Morphological image analysis: Principles and applications*. Springer, 2003.
- [14] B. ter Haar Romeny. *Front-end vision and multi-scale image analysis*. Computational Imaging and Vision. Springer, 2003.
- [15] L. Vincent. Morphological grayscale reconstruction in image analysis: Applications and efficient algorithms. *IEEE Trans. Image Processing*, 2(2):176–201, avril 1993.
- [16] I. Young and L. van Vliet. Recursive implementation of the Gaussian filter. *Signal Process.*, 44(2):139–151, juin 1995.
- [17] B. Zhang, M. Fadili, J.-L. Starck, and J.-C. Olivo-Marin. Multiscale variance-stabilizing transform for mixed-Poisson-Gaussian processes and its applications in bioimaging. ICIP'07, San Antonio, oct. 2007.